

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 198 34 070 A 1**

51 Int. Cl.⁷:
H 01 J 49/10
G 01 N 27/62

21 Aktenzeichen: 198 34 070.2
22 Anmeldetag: 29. 7. 1998
43 Offenlegungstag: 10. 2. 2000

DE 198 34 070 A 1

71 Anmelder:
Bruker Daltonik GmbH, 28359 Bremen, DE

72 Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

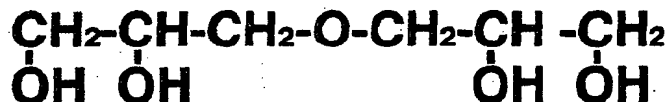
56 Entgegenhaltungen:
DE 196 18 032 A1
"Anal. Chem." 65(1993)2608-13;
Beyer/Walter: "Lehrbuch der organischen Chemie"
S. Hitzel Verlag, Stuttgart (1981), S.110,111,
140,283,290;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Ionisierung hochmolekularer Substanzen durch Laserdesorption aus flüssigen Matrices

57 Die Erfindung betrifft die fragment- und adduktarme Ionisierung hochmolekularer Analytmoleküle, insbesondere großer Biopolymere, durch matrix-unterstützte Laserdesorption (MALDI) aus flüssigen Matrixes für die massenspektrometrische Untersuchung der entstehenden Ionen, insbesondere für deren Molekulargewichtsbestimmung. Die Erfindung besteht darin, als Matrixsubstanzen Flüssigkeiten mit extrem niedrigen Dampfdrücken aus der Gruppe der mindestens dreiwertigen Alkohole mit mindestens einer Etherbindung (Ether-Polyole oder Polyether-Polyole) zu benutzen. Diese können durch Infrarot-Laser direkt zur Energieaufnahme und Ionisation benutzt werden (IR-MALDI), durch Auflösen absorbierender Substanzen für andere Wellenbereiche können aber auch andere Laser, beispielsweise übliche UV-Laser, verwendet werden.



DE 198 34 070 A 1

nutzen.

Glycerin diente bereits vor ein bis zwei Jahrzehnten als flüssiges Medium für die Ionisierung von gelösten Substanzen durch Beschuß mit schnellen Neutralteilchen (fast atom bombardment, "FAB"). Auch mit dieser Methode wurden hochempfindlich sehr fragment- und adduktarme Spektren von Molekülen relativ hohen Molekulargewichts erhalten.

Über den Grund der ähnlich hohen Ionisierungswirkung des Glycerins in diesen doch sehr verschiedenartigen Ionisierungsmethoden kann bisher nur spekuliert werden. So scheint es möglich, daß große Moleküle, die sich praktisch immer gemischt aus hydrophoben und hydrophilen Gruppen (amphiphile Substanzen) zusammensetzen, sich bevorzugt mit ihrer mehr hydrophoben Seite an der Oberfläche aufhalten, und nur mit ihrer hydrophilen Seite in die sehr polare Lösung ragen. Dieser Effekt mag zu einer starken Erhöhung der Konzentration dieser Hochpolymere an der Oberfläche führen. Andererseits kann möglicherweise Glycerin (1,2,3-Propantriol) als dreiwertiger Alkohol besonders leicht andere Substanzen durch Protonenabgabe aus einer der Alkoholgruppen ionisieren. Auch Schockwellenausbreitungen in der Flüssigkeit mit Abschütteln von Oberflächenmolekülen sind diskutiert worden. Es ist auch bekannt, daß das sehr polare Wasser als Matrix verwendet werden kann, dabei bedarf es aber einer extremen Kühlung der Trägerplatten im Vakuum, um sofortiges Verdunsten zu vermeiden.

Die Ionisierung mittelst Glycerins bietet neben einigen Vorteilen aber auch schwerwiegende Nachteile.

Vorteile: Neben der hohen Empfindlichkeit für sehr große Moleküle, der relativen Fragment- und Adduktarmut steht besonders die gleichmäßige Ionisierungsausbeute über die ganze Tropfenoberfläche hinweg auf der Liste der Vorteile. Da keine visuelle Kontrolle des Beschußortes mehr notwendig ist, wird ein automatisiertes Verfahren ermöglicht, anders als es bisher bei den MALDI-Verfahren mit Tröpfcheneintrocknung zu festen Matrices der Fall war. Als Vorteil ist auch zu zählen, daß sich die Proben relativ leicht präparieren lassen; auf ein Tröpfchen Glycerin kann einfach ein Tröpfchen mit wäßriger Analytlösung aufgebracht werden. Die Präparation sehr einfach kann in Pipettierautomaten erfolgen. Das Wasser verdampft (zumindest zu großen Teilen) beim Einbringen ins Vakuum des Massenspektrometers.

Nachteile: Auf der Liste der Nachteile stehen besonders die relativ kurzzeitige Verwendbarkeit und die starke Belastung des Vakuumsystems; sowohl wegen dieser Belastung des Vakuums wie auch wegen der Kurzfristigkeit lassen sich mit dieser Methode leider nicht Hunderte von Proben auf einem Probenträger analysieren. Schon bei zehn Proben auf einem Träger tritt eine spürbare Belastung des Vakuumsystems und damit auch der Spektrengüte auf, die durch den schlechten Druck im Spektrometer beeinflußt wird. Das steht einem immer stärker werdenden Verlangen nach hohem Probendurchsatz entgegen, für die nicht nur zehn, sondern eher tausend Proben auf einem Probenträger verlangt werden. Diesem Nachteil kann dabei durch eine starke Kühlung der Probenträgerplatte außerhalb des Vakuums, in der Probenträgerschleuse und im Vakuum begegnet werden, jedoch ist eine solche Kühlung schwierig (die Trägerplatte befindet sich im Massenspektrometer auf einem Potential von 30 kV) und in kommerziellen Massenspektrometern nicht vorhanden.

Für diesen hohen Probendurchsatz der Analyse ist natürlich nicht nur eine Automatisierbarkeit der MALDI-Ionisierung, sondern aller Analysenschritte einschließlich der Vorbereitung der Proben unbedingt notwendig. Diese ist aber, wie oben schon angedeutet, bei der Verwendung von Glycerin als Matrixsubstanz in idealer Weise gegeben, in der Regel besser als bei Verwendung fester Matrixsubstanzen.

Aufgabe der Erfindung

Es ist die Aufgabe der Erfindung, ein hochempfindliches und automatisierbares Verfahren für die pulsartige und schonende Ionisierung sehr großer Moleküle ohne wesentliche Fragment- oder Adduktbildung zu finden, das es erlaubt, viele Proben gleichzeitig (möglichst mehr als tausend) auf einen Probenträger aufbringen und ohne wesentliche Belastung des Vakuumsystems analysieren zu können.

Erfindungsgedanke

Die Erfindung besteht darin, für MALDI flüssige Matrices aus mehrwertigen (mindestens dreiwertigen) Alkoholen zu verwenden, die jedoch gegenüber dem bisher verwendeten Glycerin durch Verlängerung der Kohlenstoffketten und den Einbau von mindestens einer Etherbindung einen wesentlich niedrigeren Dampfdruck besitzen. Diglycerin, Triglycerin und Polyglycerin (Trivialnamen, Bezugsquelle: Solvay Alkali GmbH, Düsseldorf) gehören zu dieser Gruppe von Flüssigkeiten. Dabei kann durch die Verwendung von Infrarot-Lasern eine direkte Anregung der Matrixmoleküle erfolgen, es kann aber durch Auflösen von Absorbentien für Licht anderer Wellenlängen auch eine Anpassung an andere Laserarten erfolgen.

Es hat sich in Experimenten erwiesen, daß ein hoher Anteil an OH-Gruppen (Hydroxygruppen) für die Funktion als MALDI-Matrixsubstanz wesentlich ist. Der hohe Anteil an diesen alkoholischen OH-Gruppen trägt einerseits (neben der Kettenverlängerung an sich) zur Erniedrigung des Dampfdrucks bei, er erscheint aber auch für die Energieaufnahme, für die Konzentrierung von Analytmolekülen an der Oberfläche und für die Ionisierung wichtig zu sein. Im Falle von Erbium-YAG-Lasern dienen diese Hydroxygruppen insbesondere auch zur direkten Aufnahme der Energie aus der Laserstrahlung.

Nun sind vierwertige Alkohole normaler Kohlenwasserstoffe (einfachste Zucker) bereits fest, daher läßt sich der Grundgedanke der Erfindung, hydroxygruppenreiche Flüssigkeiten mit extrem niedrigem Dampfdruck zu benutzen, nicht mit normalen Kohlenwasserstoff-Alkoholen realisieren. Der Einbau etherischer Bindungen in die Kohlenstoffketten vermag aber auch höhere Alkohole flüssig zu erhalten, so daß sich durch Ether-Polyole, oder durch Polyether-Polyole, Matrixflüssigkeiten der erfindungsgemäßen Art verifizieren lassen.

Zu diesen Verbindungen gehören insbesondere das vierwertige Diglycerin (Trivialname) mit dem Aufbau $\text{HOH}_2\text{C}-\text{HOHC}-\text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$, oder das fünfwertige Triglycerin $\text{HOH}_2\text{C}-\text{HOHC}-\text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$, das zwei Ether-Bindungen aufweist. Der Aufbau ähnelt den sogenannten Polyethylenglykolen, die wegen ihres extrem niedrigen Dampfdrucks als Ultrahochvakuum-Pumpenöle gebraucht werden, jedoch trotz relativ langer Kettenlängen nur zweiwertige, endständige Alkohole darstellen und sich in Experimenten als wenig geeignet für

Eine sehr günstige Ausformung des Verfahrens ist bereits durch die Verwendung von Diglycerin (Struktur in Fig. 1) statt des bisher verwendeten Glycerins als Matrixflüssigkeit gegeben. Die analytischen Eigenschaften im MALDI-Prozess sind sehr ähnlich, wie aus Fig. 4a und 4b hervorgeht. Das Diglycerin ist ein vierwertiger Alkohol mit einer Ether-Bindung, hat eine leicht ölige Konsistenz, ist mit Wasser mischbar und ergibt unter Beschuss eines Erbium-YAG-Lasers ähnlich gute Massenspektren wie Glycerin. Die Energiedichte im Laserfokus muß ein wenig höher als bei Glycerin gewählt werden, entsprechend dem höheren Siedepunkt des Diglycerins. Die Beeinflussung des Vakuums durch das Diglycerin ist aber entscheidend besser: dadurch können weitaus mehr Probentropfen aufgetragen und längere Analysenzeiten durchgehalten werden. Tropfen aus Diglycerin nehmen selbst bei einem Tag Aufenthalt im Vakuum kaum merklich ab.

Durch Auflösen von UV-Absorbentien in den flüssigen Matrixsubstanzen ist es möglich, auch die bisher üblichen UV-Laser, beispielsweise die üblichen Stickstofflaser mit 337 Nanometer Wellenlänge und 3 Nanosekunden Pulsbreite weiter zu benutzen. Mit diesen Lasern sind praktisch alle bisher kommerziell erhältlichen MALDI-Massenspektrometer ausgestattet. Als UV-Absorbentien können beispielsweise die bisher für UV-Laser benutzten Matrixsubstanzen, wie beispielsweise α -Cyano-4-Dehydrozimtsäure, benutzt werden. Da aber die Absorbentien nicht mehr die Ionisierung übernehmen müssen, können auch ganz andersartige UV-Absorbentien verwendet werden. Auch die Anpassung an Laser mit sichtbarem Licht ist möglich.

Auch die Verwendung des Triglycerins ist möglich, hier ist aber die Konsistenz bereits deutlich zäher und auch die Löslichkeit für UV-Absorbentien ist deutlich geringer. Es können aber die Polyglycerine durch weitere chemische Gruppen, beispielsweise durch eine Teilnitrierung, in ihrem Dampfdruck weiter gesenkt werden, ohne daß unter Normalbedingungen feste Substanzen entstehen. Eine Teilnitrierung kann durch Verpuffungsunterstützung auch für den MALDI-Prozess günstig wirken. Auch andere chemische Gruppen können sich günstig auf den MALDI-Prozess auswirken. Es können dabei beispielsweise chemische Gruppen eingebaut werden, die direkt eine Absorption des verwendeten Laserlichts ermöglichen.

Eigenschaften:	Glycerin	Diglycerin	Triglycerin
Kochpunkt	130°C bei 1,8 mbar	205°C bei 1,3 mbar	>240°C bei 0,2 mbar
Viskosität bei 20°C	1412 mPas	20900 mPas	86400 mPas

Die Viskosität nimmt bei höheren Temperaturen drastisch ab. So gilt für Di- und Triglycerin, daß die Viskosität bei Erwärmung auf 100°C um etwa 2,5 Zehnerpotenzen abnimmt.

Di- oder Triglycerin (und ähnliche Verbindungen) lassen sich durch ihre ölige Viskosität und ihre Benetzungsfähigkeit für hydrophile Oberflächen sehr leicht und zuverlässig mit Vielkopf-Nadelstempeln auf die MALDI-Trägerplatten übertragen (siehe Fig. 2). So kann man auf eine Metallplatte der Größe 78 mal 128 Millimeter (Größe der Biochemie häufig verwendeten Mikrotiterplatten) leicht 1536 flache Tropfen von etwa einem Millimeter Durchmesser aufstempeln. Die Zentren der Tropfen haben dann einen Abstand von 2,25 Millimetern voneinander, das entspricht einem der Sub-Rastermaße von Mikrotiterplatten (der Abstand des Grundrasters der Mikrotiterplatten beträgt 9 Millimeter).

Die 1536 Tropfen können mit einem 96-fachen Nadelkopf in 16 Schritten, mit einem 384-fachen Nadelkopf in 4 Schritten, oder auch mit einem 1536-fachen Nadelkopf in nur einem Schritt aufgetragen werden. Die Nadelköpfe mit Nadeln von etwa 0,8 Millimeter Durchmesser lassen sich relativ einfach herstellen und ergeben Reckgrößen von etwa einem Millimeter Durchmesser. Metallnadeln beispielsweise aus Edelstahl haben eine mäßige Hydrophilie und nehmen daher jeweils beim Abheben aus dem Vorratsbehälter mit Polyglycerin einen flachen Tropfen auf, der nicht abtropft und sich sehr gut überstempeln läßt. Der Kopf kann zum Bestempeln einer größeren Anzahl von Trägerplatten verwendet werden, da die Tropfen an Luft praktisch überhaupt nicht verdunsten und sich die Platten so über längere Zeit lagern lassen.

Die wäßrigen Analytlösungen können dann mit kommerziell erhältlichen Pipettierautomaten aus Mikrotiterplatten entnommen und auf die Polyglycerinropfen aufpipettiert werden. Sie vermischen sich dort diffusiv mit dem Polyglycerin.

Damit die Analytlösungen nicht von dem Polyglycerinropfen abgleiten und auf die Trägerplatte abfließen, bevor eine Lösung stattfindet, ist es zweckmäßig, die Umgebung der Trägerplatte um die Polyglycerinropfen herum sehr hydrophob zu machen. Die Polyglycerinropfen können dabei auf hydrophilen Ankerflecken aufsitzen. Sie nehmen dabei präzise die Form und vorbekannte Stelle des hydrophilen Ankerflecks ein, günstig für ein automatisches MALDI-Verfahren, das auf diese Weise nicht erst die Flecken suchen muß. Diese hydrophobe Strukturierung der Trägerplatte ist auch wichtig, um die Probenflecken klein und damit die Abdampfung extrem gering zu halten.

Die Polyglycerine reagieren wegen ihrer starken Polarität durch die vielen OH-Gruppen genau so auf hydrophile und hydrophobe Oberflächen wie das ebenfalls stark polare Wasser.

Die Oberflächen bisher verwendeter metallischer Probenträger sind in der Regel von Natur aus leicht hydrophil, ein Probentropfen fließt normalerweise so weit auseinander, bis ein durch die Hydrophilie bestimmter, flacher Anstellwinkel erreicht ist. Die Hydrophilität wird durch die Hydroxygruppen erzeugt, die sich unter der Einwirkung von feuchter Luft auf jedem Metall (selbst auf Edelmetallen) bilden.

Um hydrophobe Oberflächen der Probenträger zu erhalten, kann die ganze Probenträger aus einem hydrophoben Material gefertigt werden, beispielsweise aus Teflon®. Es ist aber dann dafür zu sorgen, daß die Oberfläche (beispielsweise durch Einlagerung von Graphit) elektrisch leitend wird, da der MALDI-Prozess für die gleichmäßige Beschleunigung der gebildeten Ionen einerseits ein homogenes elektrisches Feld und andererseits eine Ableitung von Ladungen braucht, deren Polarität zu der der gebildeten Ionen entgegengesetzt ist. Auch eine reine Graphitoberfläche ist sehr hydrophob.

sem Sinne benutzt werden. Das Wasser kann durch Evakuierung wieder entfernt werden.

Die so präparierten Blotmembranen lassen sich direkt auf Trägerplatten spannen und durch entsprechende Scanverfahren unter jeweils punktförmiger MALDI-Ionisierung im Massenspektrometer untersuchen. Es können aber auch die Blotmembranen in direkten Kontakt mit Trägerplatten gebracht werden, wobei nach vorsichtigem Abziehen der Blotmembran ein Teil der klebrigen Matrixflüssigkeit auf der Trägerplatte zurückbleibt und dort auf die enthaltenen Eiweiße hin massenspektrometrisch untersucht werden kann. Diese Übertragung kann durch geschickte Ausnutzung von Temperaturdifferenzen sehr effektiv gemacht werden, ohne die laterale Auflösung der Eiweißverteilung zu stören. Es ist sogar möglich, durch ein sehr feines, hydrophil-hydrophobes Raster der Trägerplatte eine Trennung der Matrixflüssigkeit auf der Trägerplatte in sehr feine Tröpfchen zu erzwingen und so eine weitere laterale Diffusion der Eiweiße vollständig zu verhindern.

Es soll hier betont werden, daß alle diese Arten der Analysen nur durch den extrem niedrigen Dampfdruck der erfindungsgemäßen Matrixflüssigkeiten ermöglicht werden. Die Verwendung von einfachem Glycerin, wie bisher benutzt, erlaubt diese Vorgehensweise nicht, da das Vakuum im Massenspektrometer zu stark beeinträchtigt wird und auch eine längere Analysenzeit für das Scannen vieler Proben oder größerer Flächen wegen des schnellen Austrocknens nicht zur Verfügung steht.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Ionisierung hochmolekularer Analytsubstanzen, die sich in flüssiger Matrixsubstanz auf einer Trägerplatte befinden, durch gepulste Laserdesorption (MALDI), **dadurch gekennzeichnet**, daß Matrixflüssigkeiten aus der Gruppe der mindestens dreiwertigen Alkohole mit mindestens einer Etherbindung in der Kohlenstoffkette eingesetzt werden (Ether-Polyole).
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Diglycerin, Triglycerin, höhere Polyglycerine oder Mischungen aus diesen als Matrixflüssigkeiten verwendet werden.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanzen der Matrixflüssigkeiten neben den Hydroxygruppen der Alkohole und dem Sauerstoff der etherischen Bindung weitere chemische Gruppen enthalten.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ein Infrarot-Puls laser verwendet wird, der direkt die Moleküle der Matrixflüssigkeiten anregt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß ein Erbium-YAG-Laser verwendet wird, der die Streckschwingungen der Hydroxygruppen anregt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß ein Laser beliebiger Wellenlänge verwendet wird, und daß in den Matrixflüssigkeiten stark absorbierende Substanzen für das Licht mit der Wellenlänge des Lasers gelöst werden.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß übliche UV-Laser, beispielsweise Stickstofflaser mit 337 Nanometer Wellenlänge, verwendet werden.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Strahlungsabsorbentien übliche Matrixsubstanzen für UV-MALDI verwendet werden.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß auf der Trägerplatte mindestens 96 Proben aufgebracht sind.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Analytlösungen für jede Probe erst auf der Trägerplatte mit der Matrixflüssigkeit, die gegebenenfalls Absorbentien enthält, gemischt werden.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß erst die Tröpfchen der Matrixflüssigkeit (gegebenenfalls mit Absorbentien) auf die Trägerplatte aufgestempelt werden, worauf die Analytlösungen mit den verschiedenartigen Analytmolekülen auf die Matrixtröpfchen aufgebracht werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß viele Tröpfchen der Matrixsubstanz gleichzeitig mit einem Vielfachstempel aufgestempelt werden.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Analytlösungen auf die Matrixtröpfchen aufpipettiert werden.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß mit einer Vielfachpipette viele Proben tröpfchen gleichzeitig auf die Matrixtröpfchen aufgetragen werden.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrixsubstanz auf hydrophile Bereiche der Trägerplatte aufgebracht werden, die von hydrophoben Randgebieten umgeben sind.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrixflüssigkeit, gegebenenfalls mit gelösten Absorbentien, für die Analyse von Biopolymeren direkt auf eine Biopolymere enthaltende Blotmembran aufgebracht wird.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die mit Matrixflüssigkeit versehene Blotmembran direkt auf einen Probenträger aufgespannt der MALDI-Analyse zugeführt wird.
18. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß ein Teil der Matrixflüssigkeit aus der Blotmembran durch Kontakt mit einer Trägerplatte auf diese übertragen und dann einer MALDI-Analyse zugeführt wird.
19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der Matrixflüssigkeit gelöstes Wasser vor-Einbringen in das Vakuum des Massenspektrometers unter vermindertem Druck und gegebenenfalls unter Erwärmung des Probenträgers abgedampft wird.
20. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Abdampfen des Wassers, eventuell unter vor-

- Leerseite -